

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/064784 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12, 15/81, 1/18, C07K 14/62, C12Q 1/02, 1/54 // (C12N 1/18, C12R 1:865)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01373

(22) Internationales Anmelde datum:
9. Februar 2002 (09.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 06 718.6 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder: MÜLLER, Günter; Im Haindell 1b, 65843 Sulzbach a. Ts. (DE). KOLLER, Klaus-Peter; Carl-Orff-Weg 12, 65812 Bad Soden (DE). BOLES, Eckhard; Röntgenweg 5, 40591 Düsseldorf (DE). WIECZORKE, Roman; Frankenstrasse 13, 40476 Düsseldorf (DE). DLU-GAI, Silke; Burscheiderstr. 40, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: YEAST STRAIN OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH FUNCTIONAL EXPRESSION OF A GLUT TRANSPORTER

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MIT FUNKTIONELLER EXPRESSION EINES GLUT-TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention relates to a yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* which, due to deletion of the genomic sequences, does not produce any hexose transporters and which as a consequence cannot propagate on substrates that have hexose as the only carbon source. The capability of the strain of propagating on substrates that have hexose as the only carbon source can be re-established by expression of a GLUT4 gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der genetischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

WO 02/064784 A2

Beschreibung

Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit funktioneller Expression eines Glu-
5 Transporters

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher
durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr
ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger
10 Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf
einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren
wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

Die meisten heterotrophen Zellen transportieren Glukose über spezielle
15 Transporterproteine ins Zellinnere. Bei den verschiedenen Organismen haben sich
unterschiedliche Mechanismen herausgebildet, die den Glukosetransport vermitteln,
also Protonen-Symportsysteme, Na^+ -Glukosecotransporter,
bindungsproteinabhängige Systeme, Phosphotransferasesysteme sowie Systeme
für die erleichterte Diffusion. Bei den Eukaryonten vermittelt eine Familie von
20 Glukosetransportern, die bei Säugetieren von den GLUT-Genen und bei
Saccharomyces cerevisiae von den HXT-Genen codiert werden, die
Glukoseaufnahme über erleichterte Diffusion. Diese Transporter zählen zu einer
größeren Zuckertransport-Superfamilie und sind durch das Vorliegen 12
transmembranöser Helices und mehrerer konservierter Aminosäurereste und –
25 motive gekennzeichnet.

Der Glukosetransport bei Säugetieren war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen,
da die Kenntnis der Vorgänge bei Krankheiten, die mit einer defekten
Glukosehomöostase assoziiert sind, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder
Fanconi-Bickel-Syndrom, von großer Wichtigkeit ist. Bis zum gegenwärtigen
30 Zeitpunkt sind acht Glukosetransporter (GLUT1 bis GLUT5, GLUT8,
GLUT9/SLC2A9, GLUT9 (GenBank Aufnahme-Nr. Y17803)) identifiziert worden,
welche zur erleichterten Glukoseaufnahme beitragen. Zu den Schlüsselrollen dieser
Transporter zählen die Aufnahme von Glukose in verschiedene Gewebe, ihre

Speicherung in der Leber, ihre insulinabhängige Aufnahme in die Muskelzellen und Adipozyten sowie die Glukose-Messung durch die β -Zellen des Pankreas.

GLUT1 vermittelt den Glukosetransport in die Erythrozyten und durch die Blut-Hirn-Schranke, wird jedoch auch in vielen anderen Geweben exprimiert, während GLUT4 auf insulinabhängige Gewebe, in erster Linie auf Muskel- und Fettgewebe beschränkt ist. Bei diesen insulinabhängigen Geweben stellt die Kontrolle des Targeting von GLUT4-Transportern in intrazelluläre Kompartimente oder Plasmamembrankompartimente einen wichtigen Mechanismus für die Regulierung der Glukoseaufnahme dar. In Gegenwart von Insulin wird intrazelluläres GLUT4 auf die Plasmamembran zurückverteilt, um die Glukoseaufnahme zu erleichtern. GLUT1 wird in diesen insulinabhängigen Geweben ebenfalls exprimiert, und seine Verteilung in der Zelle wird ebenfalls von Insulin beeinflußt, jedoch weniger stark. Darüberhinaus wird die relative Wirksamkeit, mit der GLUT1 oder GLUT4 den Zuckertransport katalysieren, nicht nur von dem Ausmaß des Targetings jedes Transporters an die Zelloberfläche bestimmt, sondern auch von ihren kinetischen Eigenschaften.

Die Tatsache, daß unterschiedliche Glukosetransporter-Isoformen koexprimiert werden sowie der rasche Glukosemetabolismus hat Untersuchungen bezüglich der Rolle und der genauen Eigenschaften jeder Glukosetransporter-Isoform in diesen insulinabhängigen Geweben kompliziert gestaltet. Um diese Probleme zu lösen, wurden heterologe Expressionssysteme wie Xenopus-Oozyten, Gewebekulturzellen, Insektenzellen und Hefezellen verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß Schwierigkeiten bei diesen Systemen auftraten: zu schwache Aktivität der heterolog exprimierten Transporter, eigene Glukosetransporter bei diesen Systemen, die intrazelluläre Retention eines beträchtlichen Teils der Transporter, oder sogar die Produktion inaktiver Transporter.

Bislang ist noch kein Organismus bekannt, der außer einem heterologen und funktionellen Glut4-Glukosetransportprotein kein weiteres insbesondere intrinsisches Hexosetransportprotein exprimiert. Dies führt zu einer Reihe von Nachteilen bei der Suche nach Verbindungen, welche die Transporteigenschaften des Glut4-Proteins verändern können. Solche Verbindungen wären von großem Interesse als Bestandteile von Arzneimitteln, da bekannt ist, daß Glut4 bei der

Absenkung der Blutglukosekonzentration im Zusammenspiel mit Insulin und anderen Faktoren eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe eines Organismus, der ein funktionelles Glut4-Transportprotein exprimiert, hätte man die Möglichkeit nach Verbindungen zu suchen, die den Glut4-Transporter direkt beeinflussen. Die Nebenwirkungen solcher

- 5 Verbindungen wären geringer, da keine Nebeneffekte vermittelt über Signalfaktoren auftreten würden. Außerdem wären die Handhabung und Bereitstellung des Materials im Falle eines zur Verfügung stehenden Hefestammes sehr erleichtert. Als Aufgabe der Erfindung wird deshalb die Bereitstellung eines Hefestammes angesehen, der ein funktionelles Glut4-Protein exprimiert.

10

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein

- 15 GLUT4-Gen zur Expression bringt. Solch ein Stamm kann beispielsweise durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen hergestellt werden. Hexosen soll als Bezeichnung für Aldosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Glukose, Galaktose oder Mannose sowie für Ketosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Fruktose oder Sorbose verwendet werden.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie eben beschrieben, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.

- Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich 25 drei Maltosetransporter bekannt, die, sofern sie stark genug exprimiert werden, in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter, die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Dieser Stamm enthält lediglich noch die beiden Gene MPH2 und MPH3, die zu Maltosetransportproteinen homolog sind. Die beiden Gene MPH2 und MPH3 werden bei Anwesenheit von Glukose im Medium reprimiert. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Aus diesem Stamm können Mutanten selektiert werden, die ausgehend von einem

entsprechenden Vektor Glut1 funktionell exprimieren (Stamm hxt fgy1-1).

Transformiert man in den Hefestamm hxt fgy1-1 einen Plasmidvektor, welcher ein GLUT4-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch nur sehr wenig Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut4 erfordert weitere

- 5 Anpassungen dieses Hefestamms, um einen signifikanten Glukosetransport mittels Glut4 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut4 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm hxt fgy1-1 der ein Glut4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt,
- 10 transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält, und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C beobachtet man Wachstum von vereinzelten Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die
- 15 Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Die
- 20 Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae*, welcher die Glukoseaufnahme mittels eines Glut4-Transporters ermöglicht, wird in den Beispielen ausführlich beschrieben. Dieser Stamm exprimiert keine hefe-eigenen Transporter für Hexosen und ist in der Lage mittels eines beispielsweise durch Transformation eingeführten Gens für einen Glut4-Transporter Hexosen
- 25 insbesondere Glukose in die Zelle aufzunehmen. Hefestämme mit dieser Eigenschaft wurden unter der Nummer DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ) in Braunschweig gemäß dem Budapest Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von
- 30 Patentverfahren hinterlegt (Tabelle 1).

In einer bevorzugten Ausführungsform des Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung wird ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines

Expressionspromotoren für Hefen zur Expression gebracht. Geeignete

Expressionspromotoren der Hefe sind dem Fachmann bekannt. Solche sind beispielsweise der SOD1-Promotor (Superoxiddismutase), ADH-Promotor (Alkoholdehydrogenase), der Promotor für das Gen der sauren Phosphatase, HXT2-5 Promotor (Glukosetransporter 2), HXT7-Promotor (Glukosetransporter 7), GAL2-Promotor (Galaktosetransporter) und andere. Das Konstrukt bestehend aus einem Expressionspromotor einer Hefe und einem GLUT4-Gen ist für den Zweck der Expression Bestandteil eines Hefeektors. Dieser Hefeektor kann zur Durchführung der Expression als selbstreplizierendes Partikel unabhängig vom Genom der Hefe 10 vorliegen oder stabil in das Genom der Hefe integriert sein. Als Hefeektor eignet sich grundsätzlich jede Polynukleotidsequenz, welche in einer Hefe vermehrt werden kann. Als Hefeektoren können insbesondere Hefeplasmide oder künstliche Hefechromosomen (Yeast Artificial Chromosomes) verwendet werden. Hefeektoren enthalten in der Regel einen „origin of replication“ (2μ , ars) für die Einleitung der 15 Replikation sowie einen Selektionsmarker, der üblicherweise aus einem Auxotrophiemarker oder einem Antibiotikumresistenzgen besteht. Einem Fachmann als Hefeektoren bekannt sind beispielsweise pBM272, pCS19, pEMBCYe23, pFL26, pG6, pNN414, pTV3 oder andere. Grundsätzlich kann das GLUT4-Gen jeder Spezies zur Expression gebracht werden. Bevorzugt wird ein GLUT4-Gen aus 20 Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht. Die Polynukleotid- und Aminosäuresequenzen für Glut4 sind zugänglich beispielsweise über folgende Einträge in Genbank: M20747 (cDNA; Mensch), EMBL:D28561 (cDNA; Ratte), EMBL:M23382 (cDNA; Maus), Swissprot:P14672 (Protein; Mensch), Swissprot:P19357 (Protein; Ratte) und Swissprot:P14142 (Protein; Maus). 25 Besonders bevorzugt wird das GLUT4-Gen mittels des Vektors YEp4H7-HsGlut4 (SEQ ID Nr. 9) zur Expression gebracht. Das GLUT4-Gen dieses Vektors ist menschlichen Ursprungs. Die Herstellung eines Hefeektors enthaltend ein GLUT4-Gen zur Expression in Zellen ist dem Fachmann geläufig. In den Beispielen wird die Herstellung solch eines Vektors beschrieben. Ein Hefeektor enthaltend ein Gen zur 30 Expression wird, damit es zur Expression gebracht werden kann, durch Transformation in die Hefe eingeführt. Dazu eignen sich beispielsweise Methoden wie die Elektroporation oder die Inkubation kompetenter Zellen durch Vektor-DNA. Die Transformation ist eine dem Fachmann geläufige Technik zur Einführung von

Fremd-DNA insbesondere von Plasmiden oder Vektoren in Mikroorganismen wie Hefen oder Bakterien. In der einem Fachmann bekannten Methodensammlung „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“ finden sich ausführliche Protokolle zu Transformation von Hefen, Hefevektoren, Selektion von Mutanten der Hefe oder die Expression von Proteinen in Hefen. Der Nachweis erfolgter Expression des GLUT4-Gens in einer Hefe dieser Erfindung kann insbesondere durch Northern-Blotting, Western-Blotting, Glukoseaufnahmestudien sowie Glukoseverwertungsstudien oder andere Methoden geführt werden. Beim Northern-Blotting wird isolierte RNA des zu untersuchenden Organismus auf einen Träger wie beispielsweise Nitrozellulose aufgebracht und fixiert, sowie anschließend durch Inkubation dieses mit der RNA des Organismus versehenen Trägers mit radioaktiv oder über einen Fluoreszenzfarbstoff markierter DNA einer GLUT4-Polynukleotidsequenz detektiert. Die Expression von GLUT4-mRNA in einer Hefe dieser Erfindung erkennt man am Auftreten geschwärzter Banden. Im Vergleich dazu können mit der RNA einer sonst gleichen Hefe, die aber nicht mit einem GLUT4-haltigen Expressionsvektor transformiert wurde, keine geschwärzten Banden nachgewiesen werden. Beim Western-Blotting erfolgt der Nachweis des exprimierten Proteins nach Aufbringen eines Proteinextrakts des zu untersuchenden Organismus auf einen Membranträger wie Nitrozellulose über Antikörper. Antikörper für das Glut4-Protein sind beispielsweise erhältlich von Alpha Diagnostic International, Inc., 5415 Lost Lane, San Antonio, TX 78238 USA. Über diesen Anbieter können auch die zum Nachweis des gebundenen Antikörpers erforderlichen Testsysteme bezogen werden. Der Nachweis des exprimierten Glut4-Proteins wird im Vergleich zu einem sonst gleichen Hefestamm geführt, der kein Glut4-Protein enthält. Bei Glukoseaufnahmestudien wird dem zu untersuchenden Organismus radioaktiv markierte Glukose als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. Die Hefe mit Glut4 als einzigem Glukosetransporter nimmt im Gegensatz zu einem sonst gleichen Kontrollstamm, der keinen Glut4 Transporter enthält, diese radioaktiv markierte Glukose ins Zellinnere auf. Die Glukoseverwertung kann auf Nährmedien getestet werden, die Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthalten. Der Hefestamm mit einem Glut4-Transportprotein als einzigem Glukosetransporter ist im Unterschied zur sonst gleichen Kontrolle ohne Glut4-Transporter in der Lage, sich im Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Diese eben erwähnten

Methoden sind dem Fachmann geläufig. Ausführliche Beschreibungen finden sich beispielsweise in „Current Protocols in Molecular Biology; Edited by: F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. m. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl; published by: John Wiley & Sons; 2000 (currently updated)“.

5

Die Erfindung betrifft bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei ein Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht wird.

Die Erfindung betrifft besonders bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei eine Polynukleotidsequenz enthaltend einen codierenden Bereich eines menschlichen Glut4-Gens zur Expression gebracht wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf einen oder mehrere der Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher beispielsweise unter dem Aktenzeichen DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig hinterlegt wurden. Diese Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Diese Liste enthält die Angaben zu den verwendeten Hefestämmen, in welche die Plasmide transformiert wurden, den Plasmiden sowie den Anzuchtbedingungen für diese Hefen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

- 25 a) Bereitstellung einer Hefe, die sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann;
 - b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT4-Gen umfaßt, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promoters steht;
 - c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches eine Hexose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
 - d) Selektion eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), der sich auf diesem Medium vermehrt und der die Hexoseaufnahme mittels des Glut-4 Gens unterstützt.
- Die Erfindung betrifft ebenso die Vermehrung eines solchen Stammes.

- Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut4-Gen, zur Expression bringt. Dies kann durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen, welche für die Hexosetransporter codieren, geschehen. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien.
- 5 Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter 10 anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.
- 15 20 In einer bevorzugten Ausführungsform der Herstellung eines Stammes der Hefe wie vorstehend beschrieben wird zur Transformation ein GLUT4-Gen, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht, verwendet. Zur Durchführung der Transformation sei auf das vorstehend bereits erwähnte „Methods in Yeast Genetics“ verwiesen.
- 25 Besonders bevorzugt für die Herstellung wird zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Weiterhin besonders bevorzugt wird zur Transformation ein GLUT4-Gen enthalten in einer Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 verwendet. SEQ ID Nr. 9 offenbart die Polynukleotidsequenz des Hefevektors Yep4H7-HsGLUT4. Dieser Vektor enthält eine 30 Polynukleotidsequenz unter funktioneller Kontrolle des HXT7-Promotors, welche für die Aminosäuresequenz des menschlichen GLUT4-Gens codiert. In SEQ ID Nr. 10 ist die Polynukleotidsequenz des Vektors H2rg4g2 enthalten. Das Hefeplasmid H2rg4g2 trägt ein GLUT4-Gen der Ratte unter funktioneller Kontrolle eines HXT2-

Promotors. Funktionelle Kontrolle des GLUT4-Gens durch den Promotor bedeutet, daß mittels des Promotors eine mRNA transkribiert wird, die in ein Glut4-Protein translatiert werden kann. Bezuglich der Offenbarungen der GLUT4-Sequenzen und der verwendeten Methoden sei auf das bereits vorstehend ausgeführte hierzu 5 verwiesen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- 10 a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung, der ein GLUT4-Gen exprimiert;
- b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer 15 Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines 20 Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher sich auf Substraten 25 mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt. Dieser Hefestamm wird mittels eines Hefevektors transformiert, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors enthält. Die 30 Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien. Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder

selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

- 10 Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht pro ml in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten Menge von ^{14}C - oder ^3H - markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC (Liquid Scintillation Counting = Flüssig-Szintillationszählung). Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann aber auch mittels Wachstumstests auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle erfolgen. Dazu bestimmt man die Wachstumsrate des Stammes nach Zugabe der Verbindung beispielsweise durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm und vergleicht diesen Wert mit der Wachstumsrate eines Kontrollstammes (z.B. Wildtyphefestamm).

Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wäßrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborrobotors. Solche

- 5 Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäß en oder Laborgläsern bestehen. Laborrobotor sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborrobotors wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

10

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der

- 15 nicht mit einer Verbindung in Kontakt gebracht wurde, beschrieben wurde.

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-

- 20 Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut4 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

25 Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende

30 unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut4 Protein genannt

seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder

- 5 Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.
- 10 Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglyämie) aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut.
- 15 Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme , die ein Gesundheitsrisiko beeinhaltet.
- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut4 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche
- 25 Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen,
- 30 Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, enthaltend folgende Verfahrensschritte:

a) Bereitstellung eines Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich

5 auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promoters steht.

10 b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in diesen Stamm bereitgestellt gemäß

a) aufgenommen wird;

c) Bereitstellung einer Verbindung;

d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)

15 e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;

f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen

20 gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge

25 dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt. Solche stämme sind bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM

30 14031, DSM 14032 oder DSM 14034 hinterlegt.

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter,

die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.

- 5 Transformiert man in solch einen Hefestamm einen Plasmidvektor, welcher ein Glut1-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch keine Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut1 erfordert weitere Anpassungen dieses Hefestammes, um den Glukosetransport mittels Glut1 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut1
- 10 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm, der keine intakten Hexose transportierenden Proteine mehr exprimiert mit einem Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches
- 15 Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthält und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C beobachtet man Wachstum von vereinzelten Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein
- 20 Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.
- 25 Zur Transformation eines Hefestammes wird insbesondere ein GLUT1-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Polynukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen für Glut1 sind offenbart unter den folgenden Code-Nummern der angegebenen Datenbanken: EMBL:M20653 (cDNA; Mensch), EMBL:M13979 (cDNA; Ratte), EMBL:M23384 (cDNA; Maus), Swissprot:P11166 (Protein; Mensch),
- 30 Swissprot:P11167 (Protein; Ratte), Swissprot:P17809 (Protein; Maus).

Die Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben.. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung

erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien.

Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der

- 5 Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; 10 Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahren wird ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bereitgestellt, der ein GLUT1 Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors enthält. Solche für dieses

- 15 Verfahren geeignete Stämme wurden bei der Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 14033, DSM 14026 oder DSM 14033 hinterlegt.

Ein GLUT1 Gen als Bestandteil eines Plasmids ist SEQ ID Nr. 11 oder SEQ ID Nr.

- 20 12 offenbart. SEQ ID Nr. 11 enthält die Sequenz des Hefeektors Yep4H7-HsGlut1. In diesem Plasmid ist die Polynukleotidsequenz eines menschlichen GLUT1 Gens enthalten, welches unter funktioneller Kontrolle eines HXT7-Promotors steht. SEQ ID Nr. 12 enthält die Polynukleotidsequenz des Hefeektors H2rg1g2. Dieses Plasmid enthält die Polynukleotidsequenz eines GLUT1-Gens der Ratte unter funktioneller 25 Kontrolle des HXT2-Promotors.

Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine

- 30 bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten Menge von ¹⁴C- oder ³H- markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der

Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC(Liquid Scintillation Counting; = Flüssig Szintillationszählung).

Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische

- 5 Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wäßrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

10

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborrobotors. Solche

- 15 Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäß en oder Laborgläsern bestehen. Laborrobotor sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborrobotors wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

20

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der 25 nicht mit einer Verbindung in Kontakt gebracht wurde, beschrieben wurde.

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-

- 30 Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut1 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

- Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder
- 5 menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung
- 10 von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut1 Protein genannt seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder
- 15 Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.
- Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)
- 20 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien
- 25 Fettsäuren im Blut.
- Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnormale Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme, die ein Gesundheitsrisiko beeinhaltet.
- 30 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut1 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche

—Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale 5 Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen, Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 sowie 10 die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14. Die Polynukleotidsequenzen der SEQ ID Nr. 13 und 14 codieren für Mutationen des Glut1-Gens der Ratte, die im entsprechenden Protein zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 codiert für ein Glut1-Protein, welches an Position 69 der Aminosäurekette einen Austausch von Valin durch Methionin enthält. 15 Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 codiert für ein Glut1-Protein, bei dem an Position 70 der Aminosäurekette ein Alanin durch Methionin ausgetauscht ist. Beide Proteinmutanten unterstützen die Aufnahme von Glukose bereits in einen Stamm, dessen Hexosetransporter durch Deletion ausgeschaltet sind, der aber noch nicht die Glukoseaufnahme durch das Wildtyp-Glut1-Protein unterstützt. Solche 20 Mutanten können beispielsweise über Selektion auf Suppressormutationen oder über in vitro Mutagenese erhalten werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Glut1-Protein, welches durch die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14 codiert wird.

Die Erfindung betrifft auch Hefestämme, welche eine Polynukleotidsequenz der 25 SEQ ID Nr. 13 oder eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 enthalten. Solche Hefestämme sind bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14026 und DSM 14027 hinterlegt. Für die Herstellung dieser Stämme werden Hefeektoren entsprechend der SEQ ID Nr. 13 oder 14 in einen Hefestamm transformiert, der sich auf Substraten mit Hexosen als einziger 30 Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit Hexose als einziger Kohlenstoffquelle eventuell wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein Glut1 Gen zur Expression gebracht wird. Die Zellen werden dann nach der Transformation auf einem Medium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Die sich auf diesem Medium

vermehrenden Kolonien werden isoliert. Der so transformierte Hefestamm eignet sich beispielsweise zur Durchführung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert.

5

Abkürzungen

HXT Hexose Transporter

ORF Open Reading Frame

10 PCR Polymerase Chain Reaction

Beispiele

15 Vermehrung der Hefestämme

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hefestämme stammten vom Stamm CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*) ab. Die Herstellung eines Hefestamms mit Deletionen in den Hexose-Transportergenen (HXT) wurde von Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 - 128 (1999) beschrieben: EBY.18ga (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*), EBY.VW4000 (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*). Die Medien beruhten auf 1% Hefeextrakt und 2% Pepton (YP), während die Minimalmedien aus 0,67% Difco-Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB) bestanden und Zusätze für Auxotrophiebedürfnisse sowie unterschiedliche Kohlenstoffquellen enthielten. Die Hefezellen wurden unter aerobischen Bedingungen bei 30°C auf einem Rundschüttler oder auf Agarplatten gezüchtet. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt.

30

Bestimmung der Glukoseaufnahme

Der Glukosetransport wurde als Aufnahme von D-[U-¹⁴C]-Glukose (Amersham) gemessen und die Kinetikparameter wurden aus Eadie-Hofstee-Graphiken bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und wieder in Phosphatpuffer in einer Konzentration von 60 mg (Naßgewicht) pro ml suspendiert. Die Glukoseaufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen zwischen 0,2 und 100 mM bestimmt, und die spezifische Aktivität des Substrats bewegte sich zwischen 0,1 und 55,5 kBq µmol⁻¹. Die Zellen und die Glukoselösungen wurden 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Glukoseaufnahme wurde durch Versetzen der Zellen mit radioaktiver Glukose gestartet. Nachdem 5 Sekunden lang inkubiert worden war, versetzte man mit 10 ml eiskaltem Stoppuffer (0,1 M K₂PO₄, pH 6,5, 500 mM Glukose) und die Zellen wurden rasch auf Glasfaserfiltern ($\varnothing=24$ mm, Whatman) abfiltriert. Die Filter wurden dreimal rasch mit eiskaltem Puffer gewaschen und die eingebaute Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die Hemmung durch Cytochalasin B (Endkonzentration 20 µM, gelöst in Ethanol) wurde in einem 15-Sekunden-Aufnahmetest mit 50 mM bzw. 100 mM radioaktiver Glukose gemessen, nachdem die Zellen 15 Minuten lang in Gegenwart des Hemmstoffs oder nur des Lösungsmittels inkubiert worden waren.

20

Konstruktion von H2rg4g2 (SEQ ID Nr. 10) und H2rg1g2 (SEQ ID Nr. 12)

H2rg4g2 und H2rg1g2 sind DNA-Konstrukte, welche einen HXT2-Promotor (Promotor des Glukosetransportproteins 2 der Hefe) enthalten, der funktionell mit einem GLUT4- (in SEQ ID Nr. 10) oder GLUT1-Gen (in SEQ ID Nr. 12) aus der Ratte verbunden ist. Es wurde ein 0,5 kB langes SalI/EcoRI-GAL2-Promoterfragment der Plasmide GLUT1-pTV3 bzw. GLUT4-pTV3 (Kawahara und Kawahara, Biochem J. 315, 177 – 182 (1996); Kawahara und Kawahara, Biochim. Biophys. Acta 857, 146 – 154 (1997)) jeweils mit einem 0,5 kB langen DNA-Fragment, das den Hefe-HXT2-Promoter von -452 bp bis +9 bp (Genbank: P23585) enthält, ersetzt.

Konstruktion von YE_p4H7-HsGLUT1 (SEQ ID Nr. 11) und YE_p4H7-HsGLUT4 (SEQ ID Nr. 9)

YE_p4H7-HsGLUT1 und YE_p4H7-HsGLUT4 sind Plasmide, in welchen ein

- 5 Promotorfragment der Positionen -392 bis -1 des HXT7-Promotors (Promotor des HXT7-Gens) funktionell mit einem GLUT1- (In SEQ ID Nr. 11) oder GLUT4-Gen (in SEQ ID Nr. 9) des Menschen verbunden ist. Das Fragment des Promotors wurde verwendet, da der komplette HXT7-Promotor durch Glukose reprimiert wird.
- Ein 0,4 kB langes SacI/SpeI-MET25-Promoterfragment aus p426MET25 (Mumberg 10 et al., Nucleic Acids Res. 22, 5767 – 5768 (1994)) wurde durch ein 0,4 kB langes DNA-Fragment enthaltend ein HXT7-Promoterfragment von den Positionen -392 bis -1, das mittels PCR mit den Primern P426H7-1 (SEQ ID Nr. 1) und P426H7-2 (SEQ ID Nr. 2) aus einem HXT7-Gen (Genbank:P39004) als Matrize amplifiziert worden war, ersetzt, wodurch man das Plasmid YE_p4H7 (SEQ ID Nr. 15) erhielt. Die 15 Human-GLUT1- und GLUT4-ORF (Open Reading Frame) wurden über 10 Zyklen mittels PCR mit den Primer-Paaren HSG1-F7/T2-HSG1 (SEQ ID Nr. 3,4) für Glut1 und HSG4-F7/T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 5,6) für Glut4 sowie einer humanen GLUT1 (EMBL:M20653) und humaner GLUT4-cDNA (Genbank:M20747) als Matrizen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nochmals über 10 Zyklen mit den Primern 20 T71-ORF (SEQ ID Nr. 7) sowie T2-HSG1 (SEQ ID Nr. 4) bzw. T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 6) amplifiziert. Stromaufwärts und stromabwärts der GLUT-ORF-Sequenzen enthalten die PCR-Endprodukte Sequenzen, die zur HXT7-Promoter- bzw. zur CYC1-Terminationsregion (iso-Cytochrome c1) des Plasmids YE_p4H7 homolog sind. Sie wurden gemeinsam mit dem mit EcoRI linearisierten YE_p4H7 in den Hefestamm 25 EBY.F4-1 transformiert, wobei man nach homologer Rekombination in Hefe auf einem 2%igen Maltosemedium auf Uracilprototrophie selektierte.

Expression von Ratten-GLUT1 und -GLUT4 in einem hexosetransportdefizienten Hefestamm

30

Die Hefe-Multikopie-Expressionsplasmide GLUT1-pTV3e und GLUT4-pTV3e tragen die Ratten-Glukosetransporter-gene GLUT1 bzw. GLUT4 unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren und glukosereprimierbaren Hefe-GAL2-Promoters. In beiden Konstrukten wurde der GAL2-Promoter durch den glukoseinduzierbaren Hefe-HXT2-

- Promoter ersetzt. Diese Vektoren wurden in den Hefestamm EBY.18ga (*Δhxt*) transformiert, der zur Aufnahme von keinerlei Hexosen fähig ist und daher auf Medien, die Glukose oder andere Hexosen als einzige Kohlenstoffquelle enthalten, nicht wachsen kann. Die Zellen wurden auf ein tryptophanfreies synthetisches
- 5 Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle ausplattiert. Die Transformanten wurden mit der Stempel-Methode auf das gleiche Basalmedium ohne Maltose, jedoch mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM) ausplattiert. Die Transformanten wuchsen auf den unterschiedlichen Glukosemedien nicht, nicht einmal bei bis zu einwöchiger Inkubation bei 30°C. Dies belegt, daß der
- 10 Glut1-und Glut4-Glukosetransporter in einem normalen Stamm von *S. cerevisiae* die Aufnahme von Glukose nicht unterstützen.

Aufnahme von Glukose über den Glut1-Transporter in Hefezellen

- 15 Es zeigte sich, daß nach längerer Inkubation von Glut1-Transformanten des Stamms EBY.18ga auf einem Glukosemedium sich Kolonien (im folgenden Supressormutanten oder Supressorkolonien) vermehrten konnten, die offenbar fähig wurden, Glukose aufzunehmen und zu verwerten. Deshalb plattierte man die GLUT1- und GLUT4-Transformanten auf Agarplatten aus, die ein YNB-Medium mit
- 20 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthielten. Nach Bestrahlung mit UV-Licht in einer subletalen Dosis wurden die Zellen 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Während bei den GLUT4-Transformanten keine Supressorkolonien erschienen, wuchsen auf den Agarplatten mit den GLUT1-Transformanten mehrere Supressorkolonien, die zum Wachstum auf Glukose fähig waren. Mehrere der
- 25 GLUT1-Supressormutanten wurden mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren nicht länger fähig, auf Medien, die Glukose als Kohlenstoffquelle enthielten, zu wachsen. Damit konnte gezeigt werden, daß Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle von GLUT1 abhängig war.
- 30 Nach der Neutransformierung des ursprünglichen Wildtyp-H2rg1g2-Plasmids in diese Zellen erlangte einer von mehreren Hefestämmen wiederum die Fähigkeit, auf Glukose zu wachsen. Das belegt, daß dieser Stamm eine Mutation in seinem Genom enthält, die die Hemmwirkung auf funktionelle GLUT1-Expression eliminiert.

Das mutierte Allel wurde mit *fgy1-1* bezeichnet (was für "functional expression of GLUT1 in yeast" steht), und der Stamm wurde mit der Bezeichnung EBY.S7 versehen.

- 5 Aus anderen Suppressormutanten wurden H2rg1g2-Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga (*Δhxt*) zurücktransformiert. Mehrere dieser Plasmide konnten ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen. Diese GLUT1-Sequenzen enthielten demnach
- 10 Mutationen, die das entsprechende GLUT1-Protein in der Hefe zu einem funktionellen Glukosetransporter umwandelten. Solche Mutanten enthielten beispielsweise einen Austausch von Valin nach Methionin an der Position der Aminosäure 69 (SEQ ID Nr.13) oder einen Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 (SEQ ID Nr. 14). Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 13
- 15 wurde im Mutantenscreening wie vorstehend beschrieben gefunden. Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 14 erhielt man durch in vitro Mutagenese wie im folgenden dargestellt. Das Prinzip der angewandten in vitro Mutagenese-Methode ist in Boles und Miosga (1995) beschrieben (Boles und Miosga, Curr Genet. 28, 197 – 198 (1995)). In einer ersten PCR-Reaktion wurde das Plasmid YEphH2-rGLUT1 (20 ng)
- 20 als DNA-Vorlage zusammen mit den Primern seqhxt2 (SEQ ID Nr. 16) und glutmet2 (SEQ ID Nr. 17) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min, 25 Zyklen, Taq-Polymerase). Der Primer glutmet2 enthält eine gegenüber dem normalen GLUT1-Gen geänderte Basensequenz, die zu einem Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 von
- 25 GLUT1 der Ratte führt. Das resultierende PCR-Fragment wurde mittels Agarosegelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das gereinigte PCR-Fragment (20 ng) zusammen mit dem Plasmid GLUT1-pTV3 (Kasahara und Kasahara, Biochem J. 315, 177 – 182 (1996)) als DNA-Vorlage (50 ng) und zusammen mit den Primern seqhxt2 und
- 30 seq2gal2 (SEQ ID Nr. 18) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 54°C 30 sec, 72°C 2 min, 20 Zyklen, Taq-Polymerase). Da der Primer seqhxt2 nur an das Fragment der ersten PCR-Reaktion bindet, wurden in dieser zweiten PCR-Reaktion nur solche DNA-Sequenzen amplifiziert, die zu einem

Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 führen.

Das resultierende PCR-Fragment mit dem mutierten GLUT1-Gen wurde mittels Agarosegelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt und gegen das Wildtyp GLUT1-Gen im Plasmid YEpH2-rGLUT1 ausgetauscht. Dieses Plasmid

- 5 (SEQ ID Nr. 14) wurde in den glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga (Δhxt) transformiert und ermöglichte ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle.

Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Glukose über den Glut4-

- 10 Transporter aufnehmen

Der Stamm EBY.S7 ($\Delta hxt fgy1-1$) enthält offenbar eine Genommutation, nämlich *fgy1-1*, die Glut1 befähigt, in der Hefe funktionell zu werden und die Aufnahme von Glukose durch die Plasmamembran hindurch in die Zellen zu unterstützen.

15

Nach Transformation des Stamms EBY.S7 ($\Delta hxt fgy1-1$) durch H2rg4g2 konnten Supressor-Kolonien isoliert werden, die zur Vermehrung auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle befähigt waren.

- 20 Neun dieser GLUT4-Suppressormutanten wurden über mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren ebenfalls nicht mehr fähig, auf 10 mM Glukosemedien zu wachsen, was beweist, daß das frühere Wachstum GLUT4-abhängig war. Die H2rg4g2-Plasmide wurden aus den neun Supressorstämmen wieder isoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.S7 zurücktransformiert. Keines der Plasmide konnte auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einzige Kohlenstoffquelle ein Wachstum ermöglichen. Damit wurde gezeigt, daß sie keine "aktivierte" Mutantenformen von GLUT4 enthielten. Nach der erneuten Transformation des ursprünglichen Wildtyp-
- 25
- 30 H2rg4g2 -Plasmids in die neun nunmehr plasmidfreien Supressorstämme erlangten diese alle wiederum die Fähigkeit zurück, auf Glukose wachsen zu können, und zwar im Unterschied zu Transformanten, die einen Kontrollvektor ohne Glut4-Transportproteingenen enthielten. Die entsprechenden Mutationen dieses Stammes

wurden *fgy4-X* ($x = 1 - 9$) genannt. Die mutierten Allele *fgy4-X* bewirken die funktionelle GLUT4-Expression eines in diesen Stämmen exprimierten GLUT4-Gens. Damit konnte die Aufgabe der Erfindung gelöst werden. Die Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Hefestämme dieser Erfindung.

5

Die Tabelle gibt eine Übersicht der in dieser Erfindung verwendeten Hefestämme einschließlich des Genotyp, den für die Vermehrung einzuhaltenden Wachstumsbedingungen und der jeweiligen Hinterlegungsnummer bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

10

15

20

25

30

Patentansprüche

1. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein GLUT4-Gen zur Expression gebracht wird.
- 10 2. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037.
- 15 3. Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich durch
 - a) Bereitstellung einer Hefe,
 - b) Beseitigung der Funktion aller Hexosetransporter dieser Hefe aus a) durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen.
- 20 4. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.
- 25 5. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4, wobei ein rekombinantes GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.
6. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4 oder 5, wobei das Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte stammt.
- 30 7. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040.

8. Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, erhältlich durch
- Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;
 - Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT-4 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht;
 - Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
 - Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.
9. Herstellung nach Anspruch 8, wobei zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet wird.
10. Herstellung nach Anspruch 8 oder 9, wobei zur Transformation ein Vektor, der eine Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 enthält, verwendet wird.
11. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:
- Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 10;
 - Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm, der gemäß a) bereitgestellt wird, aufgenommen wird;
 - Bereitstellung einer Verbindung;
 - In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)
 - Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
 - Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

12. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5 13. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 14. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

a) Bereitstellung eines Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT-1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promoters steht.

15 b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm bereitgestellt gemäß a) aufgenommen wird;

c) Bereitstellung einer Verbindung;

d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe gemäß a) mit einer Verbindung gemäß c)

e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;

f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

30 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei gemäß a) ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit der Stammnummer DSM 14026, DSM 14027 oder DSM14033 bereitgestellt wird.

16. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5

17. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 18. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter dem Aktenzeichen DSM 14026 oder DSM 14027.

15 19. Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 18, erhältlich durch
a) Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;
b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid enthaltend eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14;
c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium,
20 welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
d) Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.

25 20. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Valin nach Methionin an Position 69 der Aminosäuresequenz.

21. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 20 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 13.

30 22. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 20 oder 21:

23. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Alanin nach Methionin an Position 70 der Aminosäuresequenz.

24. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 23 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID
Nr. 14.

- 5 25. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 23 oder
24.

10

15

20

25

30

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit
funktioneller Expression eines Glut-Transporters

<130> 2001/0002

<140> 10106718.6

<141> 2001-02-14

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctagagctcg taggaacaat ttccgg

25

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cgactagtgt gatggtgatg gtgatgcatt ttaactttttt gattaaaatt aaaaaaaactt 60

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ttaattttaa tcaaaaaatg gagcccagca gcaag

35

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcacac ttgggaatca gc

52

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ttaattttaa tcaaaaaatg ccgtcgggct tccaa

35

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcagtc gttctcatct gg

52

<210> 7

<211> 73

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

caaagaataa acacaaaaac aaaaagttt ttaattta atcaaaaaat gtctgaattc 60
agcagcaaga agg

73

<210> 8

<211> 71

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

aagtttcttt gtctccgtcc cactcaactt tctgagaaca aatgatcgac aaataatagg 60
tttaggtaag g

71

<210> 9

<211> 7828

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgcgcgtcgq cttccaaca gataggctcc gaagatgggg aacccctca gcagcgagt 60
 actgggaccc tggccttgc tgggtctct ggggtcttg gctccctgca gtttgggtac 120
 aacattgggg tcatcaatgc ccctcagaag gtgattgaac agagctacaa tgagacgtgg 180
 ctggggaggc aggggcctga gggaccgc tccatccctc caggcaccc caccaccctc 240
 tggccctct cctggccat ctttcgtg ggccgtatga ttccctcctt cctcatgg 300
 atcatctctc agtggcttgg aaggaaaagg gccatgctgg tcaacaatgt cctggcggt 360
 ctggggggca gcctcatggg cctggccaaac gctgctgcct cctatgaaat gctcatccctt 420
 ggacgattcc tcattggcgc ctactcaggg ctgacatcg ggctgggtgcc catgtacgt 480
 ggggagattg ctcccactca cctgcggggc gcccctggga cgctcaacca actggccatt 540
 gttatcgca ttctgatcgc ccaggtgtg ggcttggagt ccctcctggg cactgccagc 600
 ctgtggccac tgctcctggg cctcacagtg ctacctgccc ttctgcagct ggtcctgt 660
 cccttcgtc cccgagagccc ccgtaccc tacatcatcc agaatctcga ggggcctg 720
 agaaagagtc tgaagcgct gacaggctgg gccgatgtt ctggagtgt ggctgagctg 780
 aaggatgaga agcggaaagct ggagcgtgag cggccactgt ccctgctcca gtcctggc 840
 agccgtaccc accggcagcc cctgatcatt ggggtcggtc tgcaagctgag ccagcagctc 900
 tctggcatca atgctgtttt ctattattcg accagcatct tcgagacagc aggggttaggc 960
 cagcctgccc atgcccacccat aggagctggt gtggtaacaaca cagtcttcac cttgggtctcg 1020
 gtgttgtgg tggagcgggc gggcgccgg acgctccatc ttctggcct ggccggcatg 1080
 tgtggctgtg ccattgtggc catctttggc ttctgtggat ttttgagat tggccctggc 1200
 cccattcctt gtttcatcg ggcggagctc ttcaagccagg gaccccgccc ggcagccatg 1260
 gctgtggctg gtttctccaa ctggacgagc aacttcatca ttggcatggg tttccagtt 1320
 gttgcggagg ctatggggcc ctacgtcttc ttcttattt cggtccctt gctgggcttc 1380
 ttcatcttca ctttcttaag agtacctgaa actcgaggcc ggacgttga ccagatctca 1440
 gctgccttcc accggacacc ctctcttta gaggcaggagg tgaaccccg cacagaactt 1500
 gagtatattttag ggccagatga gaacgactga taagcttac gataccgtcg acctcgagtc 1560
 atgttaatttag ttatgtcagc ttacattca cgcctcccc ccacatccgc tctaaccgaa 1620
 aaggaaggag tttagacaacc tgaagtctag gtccctattt atttttttat agttatgtta 1680
 gtattaagaa cgttattttt atttcaaatt ttctttttt ttctgtacag acgcgtgtac 1740
 gcatgttaaca ttatactgaa aacctgctt gagaaggttt tggacgctc gaaggcttta 1800
 atttgcggcc ggtacccaaat tcgcctata gtgagtcgta ttacgcgcgc tcactggccg 1860
 tcgttttaca acgtcggtac tggaaaacc ctggcggtac ccaacttaat cgccttgcag 1920
 cacatcccccc ttctggccagc tggcgtaata gcgaagaggc cgcacccatg cgccttccc 1980
 aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc ggcacgcgc ctgtacggc gcatthaagcg 2040
 cggcggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgtacact tgccacgcctc ctagcgcccg 2100
 ctcttttcgc ttctttccct ttctttctcg ccacgttgc cggcttcccc cgtcaagctc 2160
 taaatcgggg gctccctta gggttccgat tttagtgcattt acggcaccc gacccaaaaa 2220
 aacttgatta gggtgatggt tcacgttagt ggcacgcgc ctgatagacg gtttttcgcc 2280
 ctttgacgtt ggagtccacg ttctttataa gtggacttctt gttccaaact ggaacaacac 2340
 tcaaccctat ctcggcttat tcttttgcatt tataaggat tttgcgcatt tcggcctatt 2400
 ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa tttaacaaa atattaacgt 2460
 ttacaatttc ctgatgcggc attttctctt tacgcacatcg tgccgtatcc cacaccgc 2520
 agggtaataa ctgatataat taaattgaag ctctaatttg tgagtttagt atacatgcac 2580
 ttacttataa tacagtttt tagtttgct ggcacgcac tctcaaatat gcttcccaggc 2640
 ctgccttct gtaacgttca ccctctaccc tagcatccct tcccttgca aatagtccctc 2700
 ttccaaacaaat aataatgtca gatcctgttag agaccacatc atccacgggtt ctataactgtt 2760
 gacccaaatgc gtctcccttg tcatctaaac ccacaccggg tgcataatc aaccaatgt 2820
 aaccttcatc tctccaccc atgtctttt gagcaataaa gccgataaca aaatctttgt 2880

cgctttcgcaatgtcaaca gtacccttag tatattctcc agtagatagg gagcccttgc 2940
 atgacaattctgtaaacatc aaaaggccctc tagttccctt tgtaacttct tctgccgcct 3000
 gcttcaaacc gctaacaata cctgggccc ccacaccgtg tgcatcgta atgtctgccc 3060
 attctgctat tctgtataca cccgcagagt actgaattt gactgttatta ccaatgtcag 3120
 caaatttct gtcttcgaag agtaaaaaat tgtaacttggc ggataatgcc tttagcggct 3180
 taactgtgcc ctccatggaa aaatcagtca agatatccac atgtgtttt agtaaaca 3240
 ttttggacc taatgctca actaactcca gtaattcctt ggtggtacga acatccaatg 3300
 aagcacacaa gtttgggc ttttcgtgca tgatattaaa tagcttgca gcaacaggac 3360
 taggatgagt agcagcacgt tccttatatg tagcttcga catgatttat cttcggttcc 3420
 tgcaggttt tgttctgtgc agttgggta agaatactgg gcaatttcat gtttcttcaa 3480
 cactacatat gcgttatata accaatctaa gtctgtgctc cttccttcgt tcttccttct 3540
 gttcggagat taccgaatca aaaaaatttc aaagaaaccg aaatcaaaaa aaagaataaaa 3600
 aaaaaaatga tgaattgaat tgaaaagctg tggtatggtg cactctcagt acaatctgct 3660
 ctgatgccgc atagttaaagc cagccccgac acccgccaa accecgctgac gcgccttgac 3720
 gggcttgc tctccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 3780
 tgggtcagag gtttccaccc tcacccgaa aacgcgcgag acgaaaggcc ctcgtgatac 3840
 gcctatttt ataggtaat gtcataaataa taatggttc ttagtataat ccaatataaa 3900
 aggaaatgat agcattgaag gatgagacta atccaaattga ggagtggcag catatagaac 3960
 agctaaagg tagtgctgaa ggaagcatac gataccccgc atggaatggg ataataatcac 4020
 aggaggtact agactaccc ttcatcctaca taaatagacg catataagta cgcatttaag 4080
 cataaaacacg cactatgccg ttcttcctat gtatataat atacaggcaa cacgcagata 4140
 taggtgcgac gtgaacagt agctgtatgt ggcgcagctcg cggtgcattt tcggaagcgc 4200
 tcgttttcgg aaacgcctt aagttccat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag 4260
 gaacctcaga ggcgtttga aaaccaaaaag cgctctgaag acgcacttcc aaaaaaccaa 4320
 aaacgcaccc gactgttaacg agctactaaa atattgcgaa taccgcttcc acaaacattt 4380
 ctcaaaagta tctctttgc atataatctt gtgtatatac cctatataac ctacccatcc 4440
 accttcgct ctttgcattt gcatctaaac tcgacccctta cattttttat gtttatctct 4500
 agtattactc tttagacaaa aaaattgttag taagaactat tcataagatg aatcgaaaac 4560
 aatacgaaaa tgtaaacatt tcctatacgt agtataataga gacaaaatag aagaaaccgt 4620
 tcataatttt ctgaccaatg aagaatcatc aacgcattca ctttctgttc acaaagtatg 4680
 cgcaatccac atcggtatag aatataatcg gggatgcctt tatcttgaaa aatgcaccc 4740
 gcagcttcgc tagtaatcgt taaacgcggg aagtggagtc aggcttttt tatggaagag 4800
 aaaatagaca ccaaagttagc cttcttctaa ccttaacggc cctacagtgc aaaaagttat 4860
 caagagactg cattatagag cgccacaaagg agaaaaaaag taatctaaga tgctttgtta 4920
 gaaaaatagc gctctcgga tgcattttt tagaaacaaa aagaagtata gattctttgt 4980
 tggtaaaata ggcgtctcgc gttgcatttc tgtaacttgc aatgcagct cagattctt 5040
 gtttggaaaa tttagcgctt cgggtgcatttttcaaaaaatgaa gcacagattc 5100
 ttgcgttggta aaatagcgct ttgcgttgc atttctgttc tgtaaaaatg cagctcagat 5160
 tctttgtttt aaaaatttagc gctctcggt tgcattttttgcatttttgc aaaaatggat 5220
 atgcattcgat caggtggcac ttttcgggaa aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttat 5280
 ttctaaatac attcaaataat gtatccgc tcttgcatttgc aatgcatttgc aatgcatttgc 5340
 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtccgc tattccctt 5400
 tttgcggcat tttgcatttcc tgttttgcatttttgc aacccagaaa cgctggtaa agtaaaaatg 5460
 gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgac tggatctcaa cagcggtaa 5520
 atcccttgc gtttgcggcc cgaagaacgt ttccatgaa tgagcacttt taaagttctg 5580
 ctatgtggcg cggatttgc ccttgcatttgc gcccggcaag agcaactcgg tcgcccgcata 5640
 cactattctc agaatacgat ggttgagttac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 5700
 ggcattgcacag taagagaatt atgcattgc ggcattaaacca tgagtgataa cactgcggcc 5760

aacttacttc tgacaacgat cgaggaccg aaggagctaa ccgttttt gcacaacatg 5820
 gggatcatg taactcgct tgcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 5880
 gacgagcgtg acaccacgat gcctgttagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 5940
 ggcgaactac ttactctgc ttcccgcoaa caattaatag actggatgga ggcggataaa 6000
 gttcaggac cacttctgcg ctggccctt ccggctggct gtttattgc tgataaatct 6060
 ggagccggtg agcgtgggtc tcgcgttato attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 6120
 tcccgatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggca ctagggatga acgaaataga 6180
 cagatcgctg agataggtgc ctcaactgatt aagcatttgt aactgtcaga ccaagttac 6240
 tcatatatatac tttagattga tttaaaaactt cattttaat tttaaaaggat ctaggtgaag 6300
 atcccttttgcataatctcat gacaaaatc ccttaacgatg agtttgcgtt ccactgagcg 6360
 tcagaccccg tagaaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct ggcgtataatc 6420
 tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggcgtataatc 6480
 ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttcaagaact ctgttagcacc gcctacatac 6600
 cttctagtgt agccgttagtt aggcaccac ttcaagaact ctgttagcacc gcctacatac 6540
 ctcgcctgc taatcctgtt accagtggct gctgccgtg gcgataagtc gtgtcttacc 6660
 gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 6720
 tcgtgcacac agcccgatggc ggagcgaacg acctacacccg aactgagata cctacagcgt 6780
 gagctatgag aaagcgcac gcttccgaa gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc 6840
 ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag gggaaaacgc ctggtatctt 6900
 tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTGTG atgctcgta 6960
 ggggggcgga gcctatggaa aaacgcac gacggccct tttacgggtt cctggctt 7020
 tgctggcctt ttgctcacat gtttttctt gcttatccc ctgattctgt ggataaccgt 7080
 attacccgcctt ttgagtgagc tgataaccgtc cgcgcagcc gaacgaccga ggcgcagcgt 7140
 tcagtgagcg aggaagcggc agagcgcac atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgtt 7200
 ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttccgact ggaagcggg cagtgagcgc 7260
 aacgcacattt atgtgagttt cctcaactcat taggcacccc aggcttaca ctttatgtt 7320
 ccggctccata tgggtgtgg aatttgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat 7380
 gaccatgatt acgccaacgca cgcacattaaac cctcaactaa gggacaaaaa gctggagctc 7440
 gtaggaacaa ttccggccct ctgcgtgttc ttctgaggtt catctttac atttgctt 7500
 gctggataat ttccagaggc aacaaaggaaa aatttagatgg caaaaagtgc tctttcaagg 7560
 aaaaatcccc accatcttc gagatcccgt gtaacttatt ggcaactgaa agaatgaaaa 7620
 ggagaaaaat aaaaaatata ctagaactga aaaaaaaaaa gtataaatag agacgatata 7680
 tgccaaatact tcacaatgtt cgaatctatt cttcatttgc agctattgtt aataataaa 7740
 acatcaagaa caaacaagct caacttgc tttctaaagaa caaagaataa acacaaaaac 7800
 aaaaagtttt tttaattttatcaaaaaa

7828

<210> 10
 <211> 2386
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 10

tcgactctag aggatcccct taagctaatac cttatgaatc cggagaaaag cggggcttt 60
 taactcaata aaattttccg aaatcctttt tcctacgcgt tttcttccgg aactagatag 120
 gtggcttcc cacctgtttt tccatcattt tagttttcg caagccatgc gtgcctttc 180
 gtttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgcccgcata acgatagtaa 240
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtgcgc catttttat gtttcaaaa 300

cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatgt tccggattc acaaatgata taaaaagcga 360
ttacaattct acattctaac cagatttgag atttccttct tctcaattcc tcttatatta 420
gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctaat 480
tccagcagat cggctctgaa gatgggaac cccctcagca gcgagtgact gggacactgg 540
tccttgctgt attctcagct gtgcttgct cccttcagtt tggctataac attggagtca 600
tcaacgcccc acagaaagtg attgaacaga gctacaatgc aacttggctg ggttaggcagg 660
gtcctgggg accggactcc atcccacaag gcaccctcac tacccttgg gctctctccg 720
tgccatctt ctctgtgggt ggcatgatt ctccttctt cattggcatc atttctcaat 780
ggtgtggaaag gaaaagggt atgctggcca acaatgtctt ggctgtgctg gggggcgccc 840
tcatgggcct agccaatgcc gcggcctcct atgagatact cattctcgga cggttcctca 900
ttggcgccctta ctcaggccta acatcagggt tggcctat gtatgtggga gaaatcgccc 960
ccactcatct tcggggtgcc ttggaaacac tcaaccaatt ggccatcgtc attggcattc 1020
tggttgccca ggtgtgggt ttggagtcta tgctggcac agtaccctg tggccattgc 1080
ttctggctat cacagtaactc ctcgtctcc tgcagctgct tctgttgcctt ttctgtcctg 1140
agagcccccg atacctctac atcatccgga acctggaggg gcctgcccga aagagtctaa 1200
agcgcctgac aggctggct gatgtgtctg atgcactggc tgagctgaag gatgagaaac 1260
ggaagttgga aagagagcgt ccactgtcct tgctcagct cctgggcagc cgacccacc 1320
ggcagcctct gattattgca gtgggtctgc agctgagcca gcagctctca ggcataatg 1380
ctgtttctta ctattcaacc agcatcttgc agtagctgg ggtggaaacag ccagcctacg 1440
ccaccatagg agctgggtgtg gtcaataccg tcttcacgtt ggtctcggtg ctcttagtag 1500
agcgagctgg gcgacggaca ctccatctcc tggcctggc aggcatgtgt ggctgtgcc 1560
tcttgatgac ggtggctctg ctgctgtgg agcgggttcc atccatgagt tatgtgtcca 1620
tcgtggccat atttggcttt gtggccttct ttgagattgg tccctggcccc atcccctgg 1680
tcattgtggc cgagctcttc agccaggccc cccgcccagc agccatggct gtagctgg 1740
tctccaactg gacctgtAAC ttcatgttg gcatgggtt ccagtatgtt gcgatgtca 1800
tgggtcccta cgtctccctt ctatttgccg tccctctgt tggcttcttc atcttcaccc 1860
tccttaagagt gcctgaaacc agaggccgga catttgacca gatctcgcc accttccgac 1920
ggacacccccc tctcttagag caggaggtga aaccctgtac agaacttgaa tacttagggc 1980
cagatgagaa tgactaatcg atttgaagt agacgctcca tcatctctt taattttca 2040
tgactgacgt tttttttca ttttaattt catagtattt gtttggaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
aatttccctt atcaatgata tcccttacgtatataaatt ccttacctaa acctattatt 2160
tgtgtacata tattcagagta ttattacata tataaccttt ttctctaaaa cagaaaaaaa 2220
aaaagaaaaac gataacatgc tctgccatcc tttgttcacc gagcaaaatt aaaaacgcaa 2280
aatgaattgt ccctatgaaa ttattaaagg accacatcac cagacttac tctgggggg 2340
cctctagaaa ataagtcagg tacttgccctg gactttcttc cagttg 2386

<210> 11
<211> 7777
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
atggagccca gcagcaagaa gctgacgggt cgcctcatgc tggctgtggg aggagcagt 60
cttggctccc tgcagtttgg ctacaacact ggagtcatca atgccccccca gaaggtgatc 120
gaggagttct acaaccagac atgggtccac cgctatgggg agagcatctt gcccaccacg 180
ctcaccacgc tctggccctt ctcgtggcc atctttctg ttggggcat gattggctcc 240
ttctctgtgg gcctttcgt taaccgtttt ggccggcgga attcaatgct gatgatgaac 300

ctgctggcct tcgtgtccgc cgtgctcatg ggcttctcgaa aactgggcaa gtcctttgag 360
atgctgatcc tggccgcctt catcatcggt gtgtactgcg gcctgaccac aggcttcgtg 420
cccatttatg tgggtgaagt gtcacccaca gccttcgtg gggccctggg caccctgcac 480
cagctggca tcgtcgtcgg catcctcatc gccagggtt tcggcctgga ctccatcatg 540
ggcaacaagg acctgtggcc cctgctgctg agcatcatct tcataccggc cctgctgcag 600
tgcatcgtdc tgcccttcgt ccccgagagt ccccgcttcc tgctcatcaa ccgcaacgag 660
gagaaccggg ccaagagtgt gctaaagaag ctgcgcggg cagctgacgt gacccatgac 720
ctgcaggaga tgaaggaga gagtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatcctg 780
gagctgtcc gctccccccgc ctaccggccag cccatcctca tcgctgtggt gctgcagctg 840
tcccagcage tgcgtggcat caacgctgtc ttctattact ccacgagcat ctgcgagaag 900
gcgggggtgc agcagcctgt gtatgccacc attggctccg gtatcgtaa cacggccctc 960
actgtcgtdt cgctgtttgt ggtggagcga gcaggccggc ggaccctgca cctcatagggc 1020
ctcgctggca tggcgggttg tgccatactc atgaccatcg cgctagcact gctggagcag 1080
ctaccctgga tgcctatct gagcatcggt gccatcttg gctttgtggc cttctttgaa 1140
gtgggtcctg gccccatccc atggttcatc gtggctgaac tcttcagcca gggtccacgt 1200
ccagctgcca ttgcgttgc aggctctcc aactggaccc caaatttcat tgcggcatg 1260
tgcttccagt atgtggagca actgtgtggt ccctacgtct tcatacatctt cactgtgtc 1320
ctggttctgt tcttcatctt cacctacttc aaagttcctg agactaaagg ccggaccttc 1380
gatgagatcg ctccggcctt ccggcagggg ggagccagcc aaagtataa gacacccgag 1440
gagctgtcc atccccctggg ggctgattcc caagtgtgat aagcttatacg ataccgtcga 1500
cctcgagtca tctaattatg tatgtcacgc ttacattcac gcccctcccc cacatccgct 1560
ctaaccgaaa aggaaggagt tagacaacct gaagtctagg tccctatTTTttttttata 1620
gttatgttag tattaagaac gttattttata tttcaaaattt ttcttttttt tctgtacaga 1680
cgcgtgtacg catgtaacat tatactgaaa accttgcttg agaagggtttt gggacgctcg 1740
aaggctttaa ttgcggccg gtacccaaattt cggccctatacg tgagtcgtat tacgcgcgt 1800
caactggccgt cgttttacaa cgtcgact gggaaaaccc tggcggttacc caacttaatc 1860
gccttgcagc acatccccctt ttgcggcagct ggctgtatag cgaagaggcc cgcaccgatc 1920
gccttccca acagttgcgc agcctgaatg gogaatggcg cgacgcgccc ttagcggcg 1980
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcaagcgtgac cgctacactt gcaactggccc 2040
tagcgccccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgcc cacgtcgcc ggctttcccc 2100
gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcTTTta cggcacctcg 2160
accccaaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtgtgg gcaatcgccc tgatagacgg 2220
ttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tcttaatag tggactcttgc ttccaaactg 2280
gaacaacact caaccctatac tcggcttattt ctttgattt ataaggattt ttgcccattt 2340
cgcccttattt gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 2400
tattaacgtt tacaatttcc ttagtgcggta ttcttcctt acgcatactgt ggggtatttc 2460
acaccgcata gggtaataac tgatataatt aaattgaagc tctaatttgtt gagtttagta 2520
tacatgcatt tacttataat acagttttt agtttgcgt gccgcatactt ctcaaatatg 2580
cttcccagcc tgctttctgt taaacgttacac cctctacattt agcatccctt ccctttgcaa 2640
atagtcctct tccaaacaata ataatgtcag atcctgtaga gaccacatca tccacggttc 2700
tatactgttg acccaatgcg tctcccttgcgtt catctaaacc cacaccgggt gtcataatca 2760
accaatcgta accttcatctt ctccaccca tgcgttttgcgtt agcaataaaag ccgataacaa 2820
aatctttgtc gctttcgca atgtcaacag tacccttagt atattctcca gttagataggg 2880
agcccttgca tgacaattct gctaacatca aaaggccctt aggttcctt gttacttctt 2940
ctgcccgcctg cttaaaacccg ctaacaatac ctggggccac cacaccgtt gcaatcgtaa 3000
tgtctgccc ttcgttgcattt ctgtatacac ccgcagagta ctgcaatTTTt gacttggcg gataatgcct 3060
caatgtcagc aaattttctgt tcttcgaaga gtaaaaaattt gtaatggcg gataatgcct 3120
ttagcggcctt aactgtgccc tccatggaaa aatcgtcaaa gatatccaca tgcgttttta 3180

gtaaaacaaat ttgggacct aatgcttcaa ctaactccag taattccttgcgttatggacaa 3240
catccaatga agcacacaag tttgttgct ttcgtgcata gatattaaat agcttggcag 3300
caacaggact agatgagta gcagcacgtt ctttatatgt agcttcgac atgatttatac 3360
ttcggttcct gcaggtttt gttctgtgca gttgggttaa gaatactggg caatttcatg 3420
tttcttcaac actacatatg cgtatatata ccaatctaag tctgtgtcc ttccttcgtt 3480
cttcctctg ttcggagatt accgaatcaa aaaaatttca aagaaaccga aatcaaaaaa 3540
aagaataaaa aaaaatgtat gaattgaatt gaaaagctgt ggtatggtgc actctcagta 3600
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg 3660
cgcccgtacg ggcttgtctg ctccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 3720
ggagctgcat gtgtcagagg ttttccacgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaaggccc 3780
tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggttct tagtatgatc 3840
caatatcaa gggaaatgata gcattgaagg atgagactaa tccaattgag gagtggcagc 3900
atataagaaca gctaaagggt agtgctgaag gaagcatacg ataccccgca tggaatggga 3960
taatatcaca ggaggtacta gactacctt catcctacat aaatagacgc atataagtac 4020
gcatttaagc ataaacacgc actatgccgt ttttctcatg tatatatata tacaggcaac 4080
acgcagatata ggtgcgacg tgaacagtga gctgtatgtg cgccgactcgc gttgcatttt 4140
cggaagcgct cgttttcgga aacgcttga agttcctatt ccgaagttcc tattctctag 4200
aaagtatagg aacttcagag cgctttgaa aaccaaaaagc gctctgaaga cgcaacttca 4260
aaaaacccaaa aacgcaccgg actgtaacga gctactaaa tattgcgaat accgcttcca 4320
caaacattgc tcaaaaagtat ctcttgcta tatatctctg tgctatatcc ctatataacc 4380
tacccatcca ccttcgctc cttgaacttg catctaaact cgacctctac atttttatg 4440
tttatctcta gtattactct ttagacaaaaa aaattgttagt aagaactatt catagagtga 4500
atcgaaaaca atacgaaaat gtaaacattt cctatacgtt gtatatacg acaaaaataga 4560
agaaaccgtt cataattttc tgaccaatga agaatcatca acgctatcac tttctgttca 4620
caaagtatgc gcaatccaca tcggtataga atataatcgg ggatgcctt atcttggaaa 4680
aatgcacccg cagcttcgct agtaatcagt aaacgcggga agtggagtca ggctttttt 4740
atggaagaga aaatagacac caaagtagcc ttcttctaaac cttaacggac ctacagtgc 4800
aaaagttatc aagagactgc attatagagc gcacaaaagga gaaaaaaaaatg aatctaagat 4860
gctttgttag aaaaatagcg ctctcggat gcattttgt agaacaaaaaa agaagtatag 4920
attcttgtt ggtttttatcg cgctotcgcg ttgcattttt gttctgtaaa aatgcagtc 4980
agattcttg ttgaaaaat tagcgctctc gcgttgcatt tttgttttac aaaaatgaag 5040
cacagattct tcgttggtaa aatagcgctt tcgcgttgc tttctgttct gtaaaaatgc 5100
agctcagatt ctcttggatggaa aaaaattagcg ctctcgcgtt gcattttgt tctacaaaat 5160
gaagcacaga tgcttcgttc aggtggact ttccgggaa atgtgcgcgg aacccttatt 5220
tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 5280
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtttc aacatttccg tgtcgcctt 5340
atccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gttttgttc acccagaaac gctggtgaaa 5400
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac 5460
agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgt gggactttt 5520
aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgcg ccggcaaga gcaactcggt 5580
cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 5640
cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt ccataaccat gagtgataac 5700
actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg 5760
cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc 5820
ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgc当地 5880
ctattaactg gcgaaactact tactcttagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag 5940
gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgt 6000
gataaatctg gagccggatgca gctgggtct cggctgtatca ttgcagcact gggccagat 6060

ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa 6120
 cgaaatagac agatcgctga gatagggcc tcactgatta agcattgta actgtcagac 6180
 caagtttact cataataact ttagattgat taaaacttc attttaatt taaaaggatc 6240
 taggtgaaga tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttgcgttc 6300
 cactgacgt cagaccccgt agaaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 6360
 cgcgtaatct gctgcttgca aaaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg 6420
 gatcaagagc taccactt tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 6480
 aatactgtcc ttctagtgtt gccgtatgta ggccaccact tcaagaactc tgttagcaccc 6540
 cctacatacc tcgctctgtt aatcctgtt ccagtggctg ctgcccgtgg cgataagtgc 6600
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggccgagcg gtcgggctga 6660
 acgggggggtt cgtgcacaca gcccgactt gaggcgaacga cctacaccga actgagatac 6720
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaaag ggagaaaggc ggacaggat 6780
 cggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgccc 6840
 tggtatctt atagtcctgt cgggttgc caccctgttac ttgagcgtcg atttttgtga 6900
 tgctcgtag gggggcggag cctatggaaa aacgcccacg acgcggccctt tttacgggttc 6960
 ctggcccttt gctggccctt tgctcacatg ttcttccgt cgttatcccc tgattctgtg 7020
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gcccggccg aacgaccgag 7080
 cgcagcggagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 7140
 gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacagggt ttcccgactg gaaagcgggc 7200
 agttagcgca acgcaattaa tgtgagttac ctcactcatt aggcacccca ggctttacac 7260
 tttatgttc cggctcctat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga 7320
 aacagctatg accatgatta cgccaaagcgc gcaattaacc ctcactaaag ggaacaaaag 7380
 ctggagctcg taggaacaat ttccggccccc tgcgtttct tctgagggttc atctttaca 7440
 tttgctctg ctggataatt ttccagaggca acaaggaaaa attagatggc aaaaagtgc 7500
 ctttcaagga aaaatccccca ccattttcg agatcccctg taacttattt gcaactgaaa 7560
 gaatgaaaaag gaggaaaata caaaatatac tagaactgaa aaaaaaaaaag tataaataga 7620
 gacgatatat gccaataactt cacaatgttc gaatcttattt ttcatttgca gctattgtaa 7680
 aataataaaaa catcaagaac aaacaagctc aacttgtctt ttctaagaac aaagaataaa 7740
 cacaaaaaaca aaaagttttt ttaattttaa tcaaaaaa

7777

<210> 12
 <211> 2338
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 12

tcgactctag aggatccct taagctaatac cttatgaatc cggagaaaaag cggggcttt 60
 taactcaata aaattttccg aaatcccttt tccatcgctg tttcttcggg aacttagatag 120
 gtggctttc cacctgtttt tccatcattt tagttttcg caagccatgc gtgccttttc 180
 gtttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgcggccata acgatagtaa 240
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgc cattttttt gttttcaaaa 300
 cctagcaacc cccaccaaaac ttgtcatcgt tcccgattt acaaattgata taaaaggcga 360
 ttacaattct acattctaac cagatttgag atttccttctt tctcaattcc tctttatatta 420
 gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480
 tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg agggccagtg ctcggatccc 540
 tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccccca gaaggttaatt gaggagttct 600
 acaatcaaacc atgaaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccacca ctcaccacac 660

tctgggtctct ctccgtggcc atcttctctg tcggggcat gattggttcc ttctctgtgg 720
gcctctttgt taatcgctt ggcaggcga actccatgtc gatgatgaac ctgttggcct 780
ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtccttgag atgtgtatcc 840
tggggccgctt catcatttggga gtgtactgtg gcctgaccac cggtttgtg cccatgtatg 900
tgggggaggt gtcacccaca gctctcgtg gagccctggg caccctgcac cagctggca 960
tcgtcggtgg gatccttatt gcccagggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020
acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcattccagc octgctacag tgtatcctgt 1080
tgcccttctg ccctgagagc cccccctcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140
ccaagagtgt gctgaaaaaaag cttegaggga cagccgatgt gaccggagac ctgcaggaga 1200
tggaaaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatctt gagctgttcc 1260
gctcacccgc ctaccgccag cccatcctca tcgcccgtgt gctgcagctg tcccagcagc 1320
tgcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttegagaag gcagggtgtc 1380
agcagcctgt gtatgccacc atcggctcggt gatcgtaa cacggccttc actgtgggt 1440
cgctgtcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcatttgtt ctggctggca 1500
tggcgggctg tgcgtgtctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccttgg 1560
tgccttatct gagtatcgta gccatcttgc gctttgtggc cttcttggaa gtaggcccgt 1620
gtcctattcc atgggttcat gttccggagc tgttcagcca gggggccccga cctgctgctg 1680
ttgctgtggc tggcttctct aactggaccc taaaacttcat cgtgggcatg tgcttccaaat 1740
atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcattcatctt cacggtgctg ctggactct 1800
tcttcatttc cacctacttc aaagttcctg agacccaaagg ccggacccctc gatgagatcg 1860
cttccggcctt ccggcagggg ggtgcagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920
accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctt 1980
cttaattttt catgactgac gtttttctt cattttaaat atcatagttat ttgtttgaaa 2040
aaaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttcccttacct 2100
aaacctatta ttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160
aacagggaaaa aaaaaagaaaa acgataacat gctctgcat ccttggtaa ccgagcaaaa 2220
ttaaaaaacgc aaaaatgaatt gtcctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280
tctctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggacttcttcc tccagttt 2338

<210> 13
<211> 2338
<212> DNA
<213> Ratt

```
<400> 13  
tcgactctag aggatcccct taagctaattc ctttatgaatc cgaggaaaaag cgggggtcttt 60  
taactcaata aaatttcccg aaatcccttt tcctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
gtggctcttc cacctgtttt tccatcatatt tagttttcg caagccatgc gtgcctttc 180  
gttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgccgccta acgatagtaa 240  
taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtgcgc catttttat gtttcaaaa 300  
cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccgattc acaaatgata taaaaagcga 360  
ttacaattct acattctaac cagatttgag atttcctctt tctcaattcc tcttatatta 420  
gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480  
tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctcggatccc 540  
tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgcccccca gaaggtaatt gaggagttct 600  
acaatcaaac atggaaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctcaccacac 660  
tctggttctt ctccatggcc atctttcttg tcgggggcat gattggttcc ttctctgtgg 720
```

gcctttgt taatcgctt ggcaggcgg aactccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780
 ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactggcaa gtccttgag atgctgatcc 840
 tggccgcctt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggcttgc cccatgtatg 900
 tggggaggt gtcacccaca gctttcgta gagccctggg caccctgcac cagctggca 960
 tcgtcggtt gatccttatt gcccagggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020
 acttgtggcc tctactgctc agtgcatact tcatacccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080
 tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140
 ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200
 tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatctt gagctgttcc 1260
 gtcacccgc ctaccgcag cccatcctca tcgcccgtt gctgcagctg tcccagcagc 1320
 tgcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcaggtgtgc 1380
 agcagcctgt gtatgccacc atcgctcggt gtatgcataa cacggccttc actgtgggt 1440
 cgctttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca ttcatttggt ctggctggca 1500
 tggcggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccttgg 1560
 tgcctatct gaggatcgatg gccatcttgc gctttgtggc ctttttggaa gtaggcctg 1620
 gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tggtcagcca gggggccccga cctgctgctg 1680
 ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtggccatg tgcttccaaat 1740
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatacatctt cacggtgctg ctggtaactct 1800
 ttttcatctt cacctactt aaagttctg agaccaaagg ccggacccatc gatgagatcg 1860
 cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacaccttag gагctctcc 1920
 accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980
 cttaaatttt catgactgac gtttttctt cattttatt atcatagat ttgtttgaaa 2040
 aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttcttacact 2100
 aaaccttatta ttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160
 aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataaacat gctctccat cttttgttca ccgagcaaaa 2220
 ttaaaaacgc aaaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280
 tctctgggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

<210> 14
 <211> 2338
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 14

tcgactctag aggatcccct taagctaattt cttatgaatc cggagaaaaag cgggggtcttt 60
 taactcaata aaattttccg aaatcctttt tcctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120
 gtggcttcc cacctgtttt tccatcattt tagttttcg caagccatgc gtgcctttc 180
 gttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aatataacggt acgccccta acgatagtaa 240
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc catttttat gttttcaaaa 300
 cctagcaacc cccacccaaac ttgtcatcg tcccgatttcc acaaatgata taaaaagcga 360
 ttacaattct acattctaac cagatttgag atttcctctt tctcaattcc tcttatattta 420
 gattataaga acaaacaattt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480
 tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctcggatccc 540
 tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccccca gaaggttaattt gaggagttct 600
 acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccacaca ctcaccacac 660
 tctggctctc ctccgtatgt atcttctctg tggggggcat gattgggtcc ttctctgtgg 720
 gccttttgtt taatcgctt ggcaggcgg aactccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780

ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtccttgag atgctgatcc 840
 tggccgctt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggtttgtg cccatgtatg 900
 tggggaggt gtcacccaca gtcctcgta gagcctggg caccctgcac cagctggca 960
 tcgtcggtt gatccttatt gcccagggtg tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020
 acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatacccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080
 tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140
 ccaagagtgt gctaaaaaaatgatcgagggc cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200
 taaaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatctt gagctgttcc 1260
 gtcacccgc ctaccggccag cccatcctca tcgccgtggc gtcgcagctg tcccgacgc 1320
 tgcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat ctgcgagaag gcaggtgtgc 1380
 agcagcctgt gtatgccacc atcggctcggtatcgtaa cacggcccttcaactgtgggt 1440
 cgctgttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca ttcattggc tggctggca 1500
 tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgcctgga 1560
 tgcttatctt ggtatcgta gccatcttgcgttgc ctttttggaa gtagggccctg 1620
 gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tgttcagcca gggggccccga cctgctgctg 1680
 ttgctgtggc tggcttctt aactggacct caaacttcat cgtgggcatttg tgcattccaaat 1740
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgttc tcatacatctt cacggctgctg ctggtaactct 1800
 ttcatttcattt cacctacttc aaagttctg agaccaaagg ccggacccatc gatgagatcg 1860
 ctccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctttcc 1920
 accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980
 cttatattttt catgactgac gttttttctt cattttattt atcatagttat ttgtttgaaa 2040
 aaaaaaaaaaaa aaaattttccc ttatcaatga tattttttttt attatataaa ttccatttac 2100
 aaacattttaa ttgtgtaca tatatcagag tatttttttttataaaatctt tttctctaa 2160
 aacaggaaaaa aaaaaagaaaa acgataacat gctctgcccatttgc tccgagcaaaa 2220
 ttaaaaacgc aaaatgaattt gtccttatga aatttttttttggaccacatc accagactta 2280
 ttcctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttcttccagttt 2338

<210> 15
 <211> 6360
 <212> DNA
 <213> Vektor

<400> 15

cgttaggaaca atttcgggccc cctgcgtgtt cttctgaggt tcataattttta catttgccttc 60
 tgctggataa ttttcagagg caacaaggaa aaatttagatg gcaaaaaatgc gtctttcaag 120
 gaaaaaatccc caccatctttt cgagatcccc ttgtacttat tggcaactga aagaatgaaa 180
 aggaggaaaaa tacaaaatat actagaactg aaaaaaaaaaa agtataaataa gagacgatata 240
 atgccaatac ttccacaatgt tcgaatctat ttcatttttgcgtt cagctattgt aaaataataa 300
 aacatcaaga acaaaacaagc tcaacttgc ttttctaaga acaaaagaata aacacaaaaaa 360
 caaaaaagttt ttttattttt aatcaaaaaag ttaacatgca tcaccatcac catcacacta 420
 gtggatcccc cgggctgcag gaattcgata tcaagctt cgtatccgc gacctcgagt 480
 catgtatgtt gttatgtcac gcttacatttgc acggccccc cccacatccg ctctaaaccga 540
 aaaggaagga gtttagacaac ctgaagtctt ggtccctatttatttttttta tagttatgtt 600
 agtattaaga acgttatttttatttcaaat ttttcttttttttctgtaca gacgcgtgtt 660
 cgcacatgtac attataactga aaacccctgt tgagaagggtt ttggggacgtt cgaaggcttt 720
 aatttgcggc cggtacccaa ttccgcctat agttagtcgtt attacgcgcg ctcaactggcc 780
 gtcgttttac aacgtcgtaa ctggggaaaac cctggcgtaa cccaaacttaa tcgccttgca 840

gcacatcccc ctttcgcccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tgcgccttcc 900
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgttagcgg cgcattaagc 960
 gcggcggtg tggtggttac ggcgcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc 1020
 gtcctttcg ctttcttccc ttcccttctc gccacgttcg cggcttcc cccgtcaagct 1080
 ctaaatcggg ggctccctt agggttccga ttttagtgctt tacggcacct cgaccccaaaa 1140
 aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggttttgc 1200
 cctttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tgttccaaac tggaaacaaca 1260
 ctcaacccta ttcgggtcta ttctttgat ttataaggga ttttgcgat ttcggcctat 1320
 tggttaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg 1380
 tttacaattt cctgatgcgg tatttctcc ttacgcattt gtgcggattt tcacaccgca 1440
 tagggtataa actgatataa ttaaattgaa gctctaattt gtgagtttag tatacatgca 1500
 tttacttata atacagttt ttagtttgc tggccgcattt ttctcaaata tgctcccaag 1560
 cctgctttc tgtaacgttc accctctacc ttagcatccc ttcccttgc aaatagtcc 1620
 ctccaacaa taataatgtc agatcctgtt gagaccacat catccacggc tctatactgt 1680
 tgacccaaatg cgtctccctt gtcatctaaa cccacaccgg gtgtcataat caaccaatcg 1740
 taacccatcat ctcttccacc catgtcttgg ttagcaataa agccgataac aaaatcttg 1800
 tcgctcttcg caatgtcaac agtaccctt gatatattctc cagtagatag ggagcccttgc 1860
 catgacaattt ctgctaaat caaaaggcctt ctaggttccct ttgttacttc ttctgccc 1920
 tgcttcaaacc cgttaacaat acctggccccc accacaccgt gtgcatttcg aatgtctgcc 1980
 cattctgta ttctgtatac accccgcagag tactgcaatt tgactgtatt accaatgtca 2040
 gcaaattttc tgcttcgaa gagttaaaaaa ttgtacttgg cggataatgc cttagcgcc 2100
 ttaactgtgc ctccatggaa aaaatcgttca aagatattcca catgtgttt tagtaaaca 2160
 attttgggac ctaatgcttc aactaactcc agtaattcct tggtggtagc aacatccaaat 2220
 gaagcacaca agtttggggcctt ctccgtgc atgatattaa atagcttggc agcaacagga 2280
 cttagatgag tagcagcagc ttccttatat gtagcttgc acatgattt tcttcgtttc 2340
 ctgcagggtt ttgttctgtt cagttgggtt aagaatactg ggcaatttca tgtttcttca 2400
 acactacata tgcgtatata taccaatcta agtctgtgtt cccttcgttgc ttcttccttc 2460
 tgttcggaga ttaccgaatc aaaaaaaaaaaa caaagaaaacc gaaatcaaaa aaaagaataa 2520
 aaaaaaaaaatg atgaatttggaa ttgaaaagct gtggtaggtt gcactctcgt tacaatctgc 2580
 tctgatgccg catagttaa ccagccccga caccgcggca caccgcgttgc cgcgccttgc 2640
 cgggcttgc tgctcccgcc atccgcattt acgacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 2700
 atgtgtcaga ggttttccacc gtcatcaccg aaacgcgcga gacgaaaaggg cctcgtgata 2760
 cgcctatccc tataggtttaa tgcatgata ataatggttt cttagtatga tccaatatca 2820
 aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattt aggagtggca gcatatagaa 2880
 cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccc catggaaatgg gataatatca 2940
 caggagggtac tagactaccc ttcatccatc ataaatagac gcatataagt acgcattttaa 3000
 gcataaaacac gcactatgcc gttcttctca tgatataata tatacaggca acacgcagat 3060
 ataggtgcga cgtgaacagt gagctgtatg tgccgcagctc gcggtgcatt ttccggaaagcg 3120
 ctgcgtttcg gaaacgcctt gaagttccctt ttccggaaatgg cctatcttctt agaaagtata 3180
 ggaacttcag agcgcttttggaaaaccaaaa ggcgcgttgc gacgcacttt caaaaaacca 3240
 aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga ataccgcattt cacaacacatt 3300
 gctcaaaagt atctcttgc tatatacttc tggtgtatata cccatataa cctaccatc 3360
 caccccccgc tccttgcact tgcatctaaa ctcgcacccctt acatttttta tggttgcattt 3420
 tagtattact cttagacaa aaaaattgtt gtaagaactt ttcatagagt gaatcgaaaa 3480
 caatacgaaa atgtaaacat ttccatcactg tagtattatag agacaaaata gaagaaaccg 3540
 ttccatattt tctgaccaat gaagaatcat caacgcattt accttgcattt cacaacat 3600
 ggcgcacccca catcggtata gaatataatc ggggatgcct ttatcttgc gaaatgcacc 3660
 cgcagcttcg ctagtaatca gtaaaacgcgg gaagtggagt caggctttt ttatggaaaga 3720

gaaaatagac accaaagttag ctttcttcta accttaacgg acctacagtg caaaaagtta 3780
 tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa gtaatctaag atgctttgtt 3840
 agaaaaatag cgctctcggt atgcattttt gtagaacaaa aaagaagtat agattcttg 3900
 ttggtaaaat agcgctctcg cgttgcattt ctgttctgtt aaaaatgcagc tcagattctt 3960
 tgtttggaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgttt acaaaaatga agcacagatt 4020
 cttcggttggt aaaatagcgc tttcggttg catttctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga 4080
 ttctttgttt gaaaaattag cgctctcggt ttgcattttt gttctacaaa atgaaggcaca 4140
 gatgcttcgt tcagggtggca cttttcggttggaaatgtgcgc ggaaccctta tttgttttattt 4200
 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgtat aaatgcttca 4260
 ataatatgttga aaaaggaaga gtatgagttt tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 4320
 ttttgcggca ttttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga 4380
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 4440
 gatccttgag agtttcgccc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt taaaagttct 4500
 gctatgtggc gcggattttat cccgtattta cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcgcatt 4560
 acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaaagc atcttacgga 4620
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc 4680
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgcacaacat 4740
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 4800
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgttagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 4860
 tggcgaacta cttactctag cttccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa 4920
 agttgcagga ccacttctgc gtcggccct tccggctggc tggtttattt ctgataaattc 4980
 tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggtt cattgcagca ctggggccag atggtaaagcc 5040
 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 5100
 acagatcgct gagatagggtg cctcactgtat taagcattgg taactgtcag accaagttta 5160
 ctcatatata ctttagattt attttaaact tcatttttaa tttaaaagga tcttaggtgaa 5220
 gatcctttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagtttctgt tccactgagc 5280
 gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc ttcttgcgtt ctttttttc tgccgtaat 5340
 ctgctgtttt ctaatccgtt taccagtggc tgctgcccgtt ggcgataagt cgtgtcttac 5580
 cgggttggac tcaagacgtt agttaccggtaaaggcgcag cggtcgggctt gAACGGGGGG 5640
 ttctgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactggat acctacagcg 5700
 tgagctatga gaaagcgcacca cgttcccgaa agggagaaaag ggggacaggt atccggtaag 5760
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggatct 5820
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgtt gatgctcg 5880
 agggggggcggtt ggcgttatggaaaacgcaccaacggcc tttttacgggttccctt 5940
 ttctgtgcctt tttgtcaca tggatcccttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 6000
 tattaccggcc tttgagtgag ctgataaccgc tcgccccagc cgaacgaccg agcgcagcga 6060
 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgcacca aatacgcaaa ccgcctctcc cgcgcgttg 6120
 gcccattcat taatgcagct ggcacgacag gtttccgcac tggaaagcgg gcagtgagcg 6180
 caacgcattt aatgtgagttt acctcactca ttaggcaccc caggcttac actttatgct 6240
 tccggctcctt atggtgtgtt gattgtgag cggataacaa ttccacacag gaaacagcta 6300
 tgaccatgat tacgccaaggc ggcattaa ccctcactaa aggaaacaaa agctggagct 6360

<210> 16

<211> 24

15

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

ctttctcaat tcctcttata ttag

24

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

cccgacagag aagatcatca cggagagaga ccagag

36

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

aacgtcagtc atgaaaaatt aaga

24

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.I von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezeichnungszeichen: Nr. 2: EBY.18ga / YEpH2-rGLUT1 ^{Y69M}	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14026
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>U. Wachs</i> Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: Nr. 3 : EBY.18ga / YEpH2-rGLUT1 ^{A70M}	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 14027
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: Anschrift:	<p>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>U. Weis</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: Nr. 1: EBY.18ga	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14031
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde (<input checked="" type="checkbox"/>) eine wissenschaftliche Beschreibung (<input checked="" type="checkbox"/>) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: Nr. 4: EBY.S7	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14032
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Wehs</i> Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugzeichen: Nr. 5: EBY.S7 / YEp4H7-HsGLUT1	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14033
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde (X) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>U. Weis</i> Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugzeichen: Nr. 6 : EBY.VW4000	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14034
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese Internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapestter Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-02-06

¹. Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER-VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: Nr. 7: EBY.f4-1	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14035
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: Nr. 8 : EBY.f4-4	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14036
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugzeichen: Nr. 9: EBY.f4-7	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14037
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTÜREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Weis</i> Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zurifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: Nr. 10: EBY.f4-1 / YEp4H7-HsGLUT4	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14038
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapestter Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: Anschrift:	<p>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Verwaltung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weiß</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH

D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: Nr. 11: EBY.f4-4/YEP4H7-HsGLUT4	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14039
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde (X) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>U. Wehs</i> Datum: 2001-02-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma
Deutschland GmbH
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: Nr. 12: EBY.f4-7 / YEp4H7-HsGLUT4	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14040
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: Anschrift:	<p>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>U. Watz</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/064784 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
15/81, 1/18, C07K 14/62, C12Q 1/02, 1/54 // (C12N 1/18,
C12R 1:865)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01373

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Februar 2002 (09.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 06 718.6 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: MÜLLER, Günter; Im Haindell 1b, 65843
Sulzbach a. Ts. (DE). KOLLER, Klaus-Peter; Carl-
Orff-Weg 12, 65812 Bad Soden (DE). BOLES, Eckhard;
Röntgenweg 5, 40591 Düsseldorf (DE). WIECZORKE,
Roman; Frankenstrasse 13, 40476 Düsseldorf (DE). DLU-
GAI, Silke; Burscheiderstr. 40, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 30. Oktober 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: YEAST STRAIN OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH FUNCTIONAL EXPRESSION OF A GLUT TRANSPORTER

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MIT FUNKTIONELLER EXPRESSION EINES GLUT-TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention relates to a yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* which, due to deletion of the genomic sequences, does not produce any hexose transporters and which as a consequence cannot propagate on substrates that have hexose as the only carbon source. The capability of the strain of propagating on substrates that have hexose as the only carbon source can be re-established by expression of a GLUT4 gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der genetischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

WO 02/064784 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/81 C12N1/18
 C12Q1/54 // (C12N1/18, C12R1:865)

C07K14/62 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WIECZORKE R ET AL: "Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 464, no. 3, 31 December 1999 (1999-12-31), pages 123-128, XP004260734 ISSN: 0014-5793	1-3
Y	Seite 127, letzter Abschnitt. Relevant für Erfindungen I & II page 123, right-hand column, paragraph 2	4-11, 14, 15, 18, 19

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family.

Date of the actual completion of the international search

28 March 2003

Date of mailing of the international search report

28.04.03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein. M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRUCKEBERG A L ET AL: "THE HXT2 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVIAE IS REQUIRED FOR HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORT" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 10, no. 11, 1990, pages 5903-5913, XP009007277 ISSN: 0270-7306 Relevant für Erfindungen I, II page 5908, right-hand column, paragraph 2 ---	1-3
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Comparison with Glut1 glucose transporter." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1324, no. 1, 1997, pages 111-119, XP001121502 ISSN: 0006-3002 Relevant für Erfindung I page 114, left-hand column, line 5-8; figure 3 ---	4-11
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast Saccharomyces cerevisiae." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 315, no. 1, 1996, pages 177-182, XP009002582 ISSN: 0264-6021 Relevant für Erfindung II page 177, right-hand column; figure 3 ---	14,15, 18,19
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Studies on the Glut family transporters: Use of the yeast expression system." MEMBRANE PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION AND EXPRESSION CONTROL., 1997, pages 201-212, XP001121504 International Symposium, Kyushu University Press; S. Karger AG 7-1-146, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan; P.O. Box, Allschwilerstrasse 10, CH-4009 Basel, Switzerland ISBN: 3-8055-6465-1 Relevant für Erfindung II page 201, paragraph 4 ---	14,15, 18,19
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01373

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FUKUMOTO H ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR INSULIN-RESPONSIVE GLUCOSE TRANSPORTER EXPRESSED IN HUMAN SKELETAL MUSCLE AND OTHER INSULIN-RESPONSIVE TISSUES"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 14, 1989, pages 7776-7779, XP002225835</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>Relevant für Erfindung I</p>	
A	<p>BIRNBAUM M J ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A cDNA ENCODING THE RAT BRAIN GLUCOSE-TRANSPORTER PROTEIN"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 83, 1 August 1986 (1986-08-01), pages 5784-5788, XP002068497</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>Relevant für Erfindung II</p>	
A	<p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 44, 30 October 1998 (1998-10-30), pages 29113-29117, XP001121501</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>Relevant für Erfindung III</p> <p>page 29114, left-hand column; figure 2; table 1</p>	20-25
A	<p>ASANO T ET AL: "THE ROLE OF N-GLYCOSYLATION OF GLUT1 FOR GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 36, 1991, pages 24632-24636, XP002236407</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>Relevant für Erfindung III</p> <p>table 1</p>	20-25

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 12, 13, 16, 17
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see additional sheet further information from PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplementary sheet

On the basis of the prior review under PCT Rule 40.2(e), no additional fees are to be refunded.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/01373

Continuation of I.2

Claims: 12, 13, 16, 17

The current Claims 12, 13, 16 and 17 relate to a disproportionately large number of possible compounds or methods that are not supported by the description (PCT Article 6) or that cannot be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

The International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11(entirely)

strain of *Saccharomyces cerevisiae* with suppressed hexose absorption and made to express a GLUT4 gene;
method that uses said strain for identifying a compound which stimulates or inhibits the activity of the GLUT4 protein.

2. Claims: 14, 15, 18, 19 (entirely)

strain of *Saccharomyces cerevisiae* with suppressed hexose absorption and made to express a GLUT1 gene;
method that uses said strain for identifying a compound which stimulates or inhibits the activity of the GLUT1 protein.

3. Claims: 20-25

mutants of the GLUT1 protein in which valine is replaced after methionine at position 69 (SEQ ID No: 13) or alanine is replaced after methionine at position 70 (SEQ ID No: 14); polynucleotide sequence encoding said mutants.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Institutionales Aktenzeichen

POL/EP 02/01373

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C12N15/12	C12N15/81	C12N1/18	C07K14/62	C12Q1/02
	C12Q1/54	//(C12N1/18, C12R1:865)			
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK					
B. RECHERCHIERTE GEBIETE					
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)					
IPK 7	C12N				
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen					
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)					
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data					
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile				Betr. Anspruch Nr.
X	WIECZORKE R ET AL: "Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 464, Nr. 3, 31. Dezember 1999 (1999-12-31), Seiten 123-128, XP004260734 ISSN: 0014-5793				1-3
Y	Seite 127, letzter Abschnitt. Relevant für Erfindungen I & II Seite 123, rechte Spalte, Absatz 2 -/- -				4-11, 14, 15, 18, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist					
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche			Absendedatum des internationalen Recherchenberichts		
28. März 2003			28.04.03		
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde			Bevollmächtigter Bediensteter		
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl					

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KRUCKEBERG A L ET AL: "THE HXT2 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE IS REQUIRED FOR HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORT" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 10, Nr. 11, 1990, Seiten 5903-5913, XP009007277 ISSN: 0270-7306 Relevant für Erfindungen I, II Seite 5908, rechte Spalte, Absatz 2 ---	1-3
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Comparison with Glut1 glucose transporter." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1324, Nr. 1, 1997, Seiten 111-119, XP001121502 ISSN: 0006-3002 Relevant für Erfindung I Seite 114, linke Spalte, Zeile 5-8; Abbildung 3 ---	4-11
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast Saccharomyces cerevisiae." BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 315, Nr. 1, 1996, Seiten 177-182, XP009002582 ISSN: 0264-6021 Relevant für Erfindung II Seite 177, rechte Spalte; Abbildung 3 ---	14,15, 18,19
Y	KASAHIARA TOSHIKO ET AL: "Studies on the Glut family transporters: Use of the yeast expression system." MEMBRANE PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION AND EXPRESSION CONTROL., 1997, Seiten 201-212, XP001121504 International Symposium, Kyushu University Press; S. Karger AG 7-1-146, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan; P.O. Box, Allschwilerstrasse 10, CH-4009 Basel, Switzerland ISBN: 3-8055-6465-1 Relevant für Erfindung II Seite 201, Absatz 4 ---	14,15, 18,19
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inl	tionales Aktenzeichen
PÜ1/EP 02/01373	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FUKUMOTO H ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR INSULIN-RESPONSIVE GLUCOSE TRANSPORTER EXPRESSED IN HUMAN SKELETAL MUSCLE AND OTHER INSULIN-RESPONSIVE TISSUES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 14, 1989, Seiten 7776-7779, XP002225835 ISSN: 0021-9258 Relevant für Erfindung I ---	
A	BIRNBAUM M J ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ENCODING THE RAT BRAIN GLUCOSE-TRANSPORTER PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 83, 1. August 1986 (1986-08-01), Seiten 5784-5788, XP002068497 ISSN: 0027-8424 Relevant für Erfindung II ---	
A	KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 44, 30. Oktober 1998 (1998-10-30), Seiten 29113-29117, XP001121501 ISSN: 0021-9258 Relevant für Erfindung III Seite 29114, linke Spalte; Abbildung 2; Tabelle 1 ---	20-25
A	ASANO T ET AL: "THE ROLE OF N-GLYCOSYLATION OF GLUT1 FOR GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 266, Nr. 36, 1991, Seiten 24632-24636, XP002236407 ISSN: 0021-9258 Relevant für Erfindung III Tabelle 1 ---	20-25

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. 12, 13, 16, 17 weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02 01373

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 12, 13, 16, 17

Die geltenden Patentansprüche 12, 13, 16, 17 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Verfahren, die sich nicht im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten können. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und daß eine sinnvolle Recherche unmöglich erscheint.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-11 (komplett)

Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, bei welchem die Aufnahme von Hexosen unterbunden wurde und in dem ein Glut4-Gen zur Expression gebracht wird.

Verfahren unter Verwendung des besagten Stammes zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität des Glut4 proteins stimuliert oder hemmt.

2. Ansprüche: 14, 15, 18, 19 (komplett)

Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, bei welchem die Aufnahme von Hexosen unterbunden wurde und in dem ein Glut1-Gen zur Expression gebracht wird.

Verfahren unter Verwendung des besagten Stammes zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität des Glut1 proteins stimuliert oder hemmt.

3. Ansprüche: 20-25

Mutanten des Glut1 proteins, bei welchen Valin nach Methionin and Position 69 (SEQ ID NO 13) oder Alanin nach Methionin and Position 70 (SEQ ID NO 14) ausgetauscht wurde. Polynukleotidsequenz kodierend für besagte Mutanten.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Applicant(s): Müller, et al.
Serial No.: 10/659,234
Filing Date: 9/10/2003
Docket No.: DEAV2002/0065 US NP
PRIOR ART